

Étude de la diapause embryonnaire des œufs de *Meloidogyne incognita* en culture monoxénique : technique d'inoculation, influence de l'âge de la mère et de la nutrition en potassium

Georges de GUIRAN et Marie-Ange VILLEMINE *

*I.N.R.A., Station de Recherches sur les Nématodes,
123 Bd Francis-Meilland, 06602 Antibes, France.*

RÉSUMÉ

Une technique a été élaborée pour obtenir des cultures de racines de tomate excisées ne présentant qu'une seule femelle de *M. incognita* par galle, l'âge de cette femelle étant connu à six heures près. Elle consiste à inoculer sur gélose pure 100 larves L₂ stériles par plantule de tomate désinfectée et à exciser les apex six heures plus tard pour les transférer sur un milieu Skoog - Tsui - White (STW).

La ponte et la diapause des œufs de chaque femelle ont été suivies dans le temps sur milieu STW complet et sur le même milieu carencé en potassium. Les œufs pondus sont moins nombreux sur milieu sans potassium dès la sixième semaine après la pénétration. Sur milieu complet, la diapause apparaît dès le début de la ponte et se maintient à un taux constant pendant toute sa durée. En l'absence de potassium, le pourcentage d'œufs en diapause diminue avec l'âge des femelles.

SUMMARY

*Study of the embryonic diapause of Meloidogyne incognita eggs in monoxenic culture :
- technique of inoculation, effect of age of females and potassium deficiency*

Young axenized tomato seedlings were exposed to 50 or 100 axenized second stage larvae of *Meloidogyne incognita* on pure agar. Six, eight or ten hours later, they were excised and transferred to complete or K-deficient Skoog-Tsui-White medium.

The percentage of galls bearing only one female was highest when roots were exposed to 50 larvae for six hours. Egg laying and diapause of eggs from females in single-female galls were followed from the 5th week to the 8th week after inoculation. At six weeks the average number of eggs laid per female was lower on the K-deficient medium than on complete medium, and remained lower thereafter. The percentage of eggs in diapause remained constant throughout the egg laying period on complete medium, but on K-deficient medium the percentage of diapausing eggs decreased with the age of the female.

* Adresse actuelle : Les Marnes, Sancy-les-Provins, 77320 La Ferté-Gaucher, France.

Endoparasites stricts, les *Meloidogyne* dépendent étroitement de l'état physiologique de leur hôte pour leur développement et leur reproduction. La nutrition minérale de la plante joue un rôle important dans ce domaine et, parmi les éléments nécessaires, le potassium semble avoir une influence prédominante. Dès 1911, Bessey avait signalé qu'un excès de cet élément diminuait les dommages subis par les cultures. Oteifa (1952) a montré que l'inoculation par *M. incognita* réduisait la croissance de plants de *Phaseolus lunatus*, ainsi que leur teneur en potassium. L'apport d'un excès de potassium corrigeait cette situation sauf dans le cas d'une très forte infestation. En ce qui concerne l'effet du potassium sur le nématode lui-même et en particulier sur sa reproduction, les résultats peuvent paraître contradictoires : Oteifa (1951, 1953) a montré qu'une déficience en potassium diminuait considérablement le nombre de femelles adultes de *M. incognita* dans les racines de *P. lunatus* et celui des masses d'œufs présentes à leur surface. Dropkin et Boone (1966) ont confirmé la relation directe entre nutrition potassique et ponte de *M. incognita* sur racines de tomate excisées inoculées avec une seule larve. Par contre, Ishibashi, Kegasawa et Kunii (1964) ont trouvé que les femelles de la même espèce pondaient une fois et demie plus d'œufs sur les plants de tomate totalement carencés en K. Sur concombre et patate douce, la carence en potassium n'avait pas d'effet sur la reproduction.

Mais l'état physiologique de la plante peut également influencer sur le développement des œufs pondus. Ishibashi (1969) a brièvement signalé que, chez *M. incognita*, les femelles âgées ou vivant sur des plantes cultivées sans engrais pondaient des œufs « dormants ». Dans une précédente étude, l'un des auteurs (de Guiran, 1980) a montré que l'âge des femelles et la défoliation des plants de tomate augmentaient la proportion d'œufs considérés comme étant en diapause, c'est-à-dire ayant leur développement bloqué à un stade peu différencié.

La présente étude a eu pour but de préciser l'influence combinée de l'âge des femelles et d'une carence en potassium sur la ponte et la diapause des œufs de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919), Chitwood, 1949. Afin de mieux contrôler l'environnement de l'hôte et

du nématode, l'expérimentation a eu lieu en milieu monoxénique, le nématode étant cultivé sur des racines de tomate excisées poussant sur milieu défini. Une technique d'inoculation a dû être au préalable mise au point pour connaître l'âge des femelles avec précision et pour n'avoir qu'une seule femelle par galle, ce qui évite toute concurrence nutritive entre les parasites.

L'âge des femelles ne peut être connu qu'en sachant à quel moment les larves ont pénétré dans l'hôte. Il faut pour cela laisser l'inoculum en présence des racines le moins longtemps possible. Ceci peut également éviter la pénétration multiple en un même site et la concurrence qui peut en découler.

L'inoculation avec des larves déjà écloses permet de raccourcir le temps de contact inoculum-hôte, mais « pêcher » ces larves une à une dans une suspension et les déposer au voisinage des racines est une opération longue et génératrice de contaminations. Un essai de cette méthode a montré que la pénétration était faible et le temps de mise en contact des larves avec l'hôte trop long pour permettre de fixer l'âge des femelles avec précision. Inoculer des parties aliquotes de cette suspension a l'inconvénient d'introduire, à la surface du milieu gélosé, du liquide qui peut gêner le déplacement des larves. Une autre procédure a donc été recherchée.

Mise au point d'une technique d'inoculation

MATÉRIEL ET MÉTHODES

— Des graines de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. cv. H 63-5) sont désinfectées par $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ à 4,5% pendant cinq minutes et mises à germer sur papier filtre humide et stérile.

— Trois jours après la mise en germination, des masses d'œufs de *M. incognita*, récoltées sur des plants de tomate (même cv.) poussant en serre et inoculés avec une souche issue d'une seule femelle originaire de Côte d'Ivoire, sont dissociées et stérilisées en même temps par agitation dans NaClO à 5%. La suspension d'œufs stériles est recueillie sur un tamis d'ouverture 10 μm . Après rinçage abondant à l'eau stérile, le tamis est déposé dans une boîte de Petri avec juste assez d'eau stérile pour humecter ses mailles.

— Le lendemain, soit quatre jours après la mise en germination :

1° L'eau des boîtes de Petri, qui contient les larves écloses depuis 24 heures, est transférée dans un récipient gradué : sa concentration en larves est titrée par trois prélèvements et comptages.

2° Les plantules de tomate entières sont transférées dans des boîtes de Petri contenant de la gélose pure à 15⁰/₀₀, à raison de 6 plantules par boîte.

3° Une quantité de liquide contenant 50 ou 100 larves par plantule est transférée dans un support Pyrex de filtre Millipore fixé sur une fiole à vide. Après élimination du liquide, le filtre (diamètre 25 mm, porosité 3 µm) est retourné sur la gélose de la boîte contenant les plantules et immédiatement retiré avec un glissement de façon à laisser sur la gélose les larves qui le recouvraient. En effet, il a été observé que l'abandon du filtre à la surface du milieu entraîne le piégeage des larves dans le ménisque d'eau qui l'entoure.

— Six, huit ou dix heures plus tard, les racines sont prélevées, lavées et colorées au bleu coton à froid (de Guiran, 1966). Une fois la coloration prise, elles sont écrasées entre deux plaques de verre et examinées au stéréomicroscope pour vérifier la pénétration des larves.

RÉSULTATS

L'allongement du temps de contact augmente considérablement le pourcentage de plantules infectées, que le nombre de larves inoculées soit de 50 ou de 100 (Tab. 1). Mais il aboutit également à augmenter le nombre de larves à l'intérieur d'une même plantule, ce qui peut amener entre les individus, une concurrence que l'on veut éviter. Il est donc préférable de ne laisser les larves que six heures en contact avec l'hôte. Pour ce temps de contact on constate que les pénétrations sont beaucoup plus étagées le long de la racine (Tab. 2). Cent larves par plantule et six heures de contact paraissent donc être la meilleure technique d'inoculation.

Tableau 1
Nombre et pourcentage de plantules de tomate infectées après inoculation par des larves de *M. incognita*.

Number and percent of infected tomato seedlings inoculated with M. incognita larvae

Temps de contact hôte-inoculum	Inoculum (larves par plantule)	Nombre de plantules inoculées	Plantules infectées		Plantules contenant plus de trois larves	
			Nombre	%	Nombre	%
6 heures	50	37	21	56,5	10	27
	100	63	43	68	15	24
8 heures	50	47	45	95	39	83
	100	22	21	95	17	77

Tableau 2
Localisation des larves de *M. incognita* dans les racines de tomate six heures après l'inoculation avec 50 ou 100 larves par plantule (en % des larves ayant pénétré dans l'ensemble des plantules)

Localization of M. incognita larvae in tomato seedlings roots six hours after inoculation with 50 or 100 larvae per seedling (in % of the larvae having penetrated in all the seedlings)

Larves par plantule	Nombre de plantules inoculées	mm depuis l'apex					
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	> 5
50	37	44	35	17	4		
100	63	4	47	10	10	6	23

Influences combinées de l'âge de la mère et de la nutrition en potassium

PROCÉDURE

Après inoculation selon la méthode retenue (100 larves par plantule, six heures de contact), des racines de tomate sont excisées en dessous de l'hypocotyle et repiquées chacune dans une boîte de Petri de 9 cm de diamètre contenant soit du milieu Skoog - Tsui - White (STW) complet (Netscher, 1973), soit le même milieu carencé en potassium (K zéro). Ce dernier est réalisé en remplaçant l'ion K^+ par l'ion Ca^{++} et en respectant l'équilibre ionique de la solution exprimé en milliéquivalents (Tab. 3).

Les cultures sont conservées dans une enceinte stérile à 28°. Les masses d'œufs, qui commencent à se former quatre semaines après l'inoculation, sont prélevées toutes les semaines de la cinquième à la huitième. Ceci permet de connaître la ponte d'une même femelle, semaine après semaine. La majorité des femelles avait cessé de pondre après huit semaines et les rares pontes observées au-delà ont donné des résultats inconsistants ; 52 femelles isolées ont ainsi pu être suivies sur milieu complet (STW) et 69 sur milieu K zéro. En fin de ponte, les racines ont été colorées. Elles ne contenaient effectivement qu'une femelle par galle.

Les masses d'œufs sont mises à éclore individuellement sur un tamis de nylon dans l'eau déminéralisée affleurante. Tous les deux jours l'eau est renouvelée et les larves comptées.

Au bout de 21 jours, l'éclosion étant terminée, les œufs non éclos sont colorés au New Blue R et comptés pour évaluer la ponte totale et le pourcentage de diapause (de Guiran, 1979).

RÉSULTATS

Multiplication

Le tableau 4 montre les nombres moyens d'œufs pondus par une femelle chaque semaine ainsi que le total de la ponte, sur chacun des milieux. Dès la sixième semaine (en fait la deuxième semaine de ponte), le nombre d'œufs diminue sur milieu K zéro. Le test des médianes ($\alpha < 0,01$) entre le total des œufs pondus par une femelle sur chacun des milieux. La carence en potassium entraîne donc une diminution de la fécondité des femelles.

Pourcentage de diapause

Sur chacun de ces milieux, les pourcentages moyens de diapause sur le total de la ponte ont été les suivants :

Milieu STW : 24,69%

Milieu K zéro : 25,43%

La différence n'est pas significative.

Cependant, les conclusions sont différentes si l'on considère l'évolution du pourcentage de diapause pendant le cours de la ponte. Si ce pourcentage ne change pas avec le temps pour

Tableau 3
Macroéléments contenus dans le milieu STW normal et dans le même milieu sans potassium

Macronutrients of normal STW culture medium and of the same without potassium

	STW	K zéro
MgSO ₄ , 7H ₂ O	72 mg/l	72 mg/l
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	144 mg/l	237 mg/l
KNO ₃	80 mg/l	
NH ₄ NO ₃	400 mg/l	400 mg/l
KH ₂ PO ₄	38 mg/l	
KCl	65 mg/l	
Ca (H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O		37 mg/l
CaCl ₂		48,3 mg/l
Total milliequivalents	8,75	8,75

Tableau 4

Nombre moyen d'œufs pondus chaque semaine par femelle de *M. incognita* sur racine de tomate excisée poussant sur milieu complet (STW) ou carencé en potassium (K zéro)
Test des médianes : NS : non significatif, HS : hautement significatif ($\alpha = 0,01$)

Mean number of eggs laid each week by one female of *M. incognita* on tomato excised root cultivated on complete (STW) or potassium deficient (K zero) medium
Mediane test: NS: non significant, HS: highly significant ($\alpha = .01$)

	Semaines après l'inoculation				
	5 ^e	6 ^e	7 ^e	8 ^e	Total
STW (moy. de 52 ♀)	369	377	436	354	1 536
K zéro (moy. de 69 ♀)	355	305	242	296	1 198
Test des Médianes	NS	NS	HS	NS	HS

le milieu STW complet, il a tendance à diminuer avec l'âge de la femelle sur milieu K zéro (Fig. 1).

Discussion

Les résultats obtenus confirment ceux de Dropkin et Boone (1966) : une carence en potassium diminue la production d'œufs. Ils infirment donc ceux de Ishibashi, Kegazawa et Kunii (1964). Comme ceux de Dropkin et Boone, ils ont été obtenus avec un contrôle très rigoureux de l'environnement et en l'absence de concurrence entre nématodes.

En ce qui concerne la diapause, il faut d'abord noter qu'elle apparaît en culture monoxénique sur milieu complet et sans concurrence nutritive. Elle n'a donc apparemment besoin d'aucune contrainte pour se produire et semble bien être une constante biologique chez cette espèce et sans doute chez ses proches voisines (de Guiran Villemin 1980). Les œufs en diapause apparaissent dès le début de la ponte et leur pourcentage reste constant pendant tout celle-ci. Or, sur des plantes cultivées en pot, ce pourcentage augmente avec l'âge des femelles ainsi qu'avec différentes contraintes : froid, anoxie, défoliation (de Guiran, 1980). Il faut donc penser que, dans des conditions naturelles, une lente détérioration des rapports physiologiques entre nématode et plante, peut-être due au vieillissement de l'hôte, augmente le pourcentage d'œufs en diapause. Le fait qu'en culture monoxénique ce pourcentage baisse avec le temps lorsqu'on supprime le potassium est difficilement conciliable avec

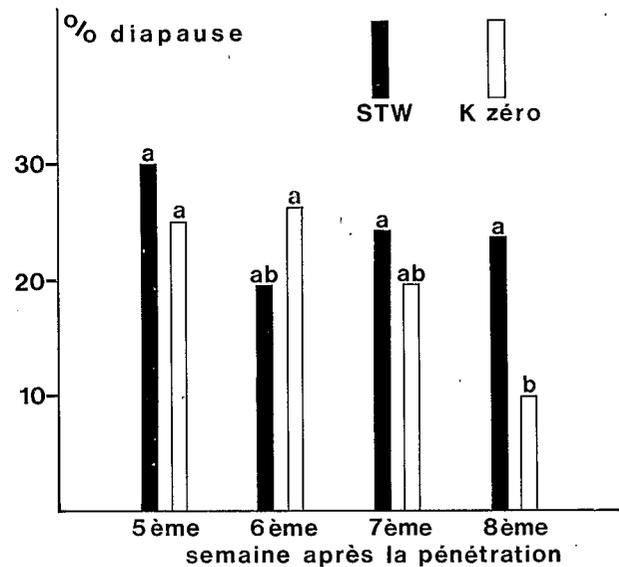


Fig. 1. Pourcentages de diapause parmi les œufs pondus chaque semaine par *M. incognita* en cultures monoxéniques sur racines de tomate. STW : sur milieu complet ; K zéro : sur milieu carencé en potassium. Les traitements affectés de la même lettre ne diffèrent pas au seuil $\alpha = 0,05$.

Percentages of diapause within eggs laid each week by *M. incognita* in monoxenic cultures on excised tomato roots. STW : on complete medium ; K zéro : on medium without potassium. Treatments bearing the same letter do not differ at the level $\alpha = .05$.

les autres résultats. Dans une perspective finaliste, la diapause apparaît en effet comme un mécanisme ayant peut-être son origine dans une quiescence qui aurait peu à peu perdu son caractère réversible, et qui permet de reporter la

poursuite du cycle dans un avenir où les conditions favorables se sont stabilisées. Comme la suppression du potassium diminue également le total des œufs pondus, il semble que cette diminution concerne surtout les œufs en diapause. Conclure que le potassium soit utile à leur apparition paraît cependant hasardeux. Les contraintes physiologiques favorisant la diapause concerneraient plutôt l'élaboration des composés organiques puisqu'une carence minérale globale n'augmente pas la diapause sur une plante en pot (de Guiran, 1980). Une étude approfondie des circonstances physiologiques de l'apparition de cette diapause est souhaitable. La méthode mise au point ici semble particulièrement bien adaptée à sa réalisation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à exprimer leur reconnaissance à Mona Abirached, Kristina Stawiecki et Lucien Bonnel pour l'aide apportée au cours de cette étude.

RÉFÉRENCES

- BESSEY, E. A. (1911). Root-knot and its control. *Bull. U.S. Dep. Agric. Bur. Plant. Industr.*, 217, 89 p.
- DROPKIN, V. & BOONE, W. R. (1966). Analysis of host parasite relationship of root-knot nematodes by single larva inoculations of excised tomato roots. *Nematologica*, 12 : 225-236.
- GUIRAN, G. de (1966). Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica*, 12 : 646.
- GUIRAN, G. de (1979). A necessary diapause in root-knot nematodes. Observations on its distribution and inheritance in *Meloidogyne incognita*. *Revue Nématol.*, 2 : 223-231.
- GUIRAN, G. de (1980). Facteurs induisant un blocage du développement des œufs de *Meloidogyne incognita* considéré comme une diapause. *Revue Nématol.*, 3 : 61-69.
- GUIRAN, G. de & VILLEMIN, M. A. (1980). Spécificité de la diapause embryonnaire des œufs de *Meloidogyne* (Nematoda). *Revue Nématol.*, 3 : 115-121.
- ISHIBASHI, N. (1969). Studies on the propagation of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949. *Rev. Plant Protec. Res.*, 2 : 125-128.
- ISHIBASHI, N., KEGASAWA, K. & KUNII, Y. (1964). Studies on the egg production of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* Chitwood. II. Effect of the growth condition of the host plant on the propagation of the nematode. *Jap. J. appl. Ent. Zool.*, 8 : 245-250.
- NETSCHER, C. (1973). Etude sur la variabilité de la longueur des larves chez *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 et *Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.*, n° 21 : 91-95.
- OTEIFA, B. A. (1951). Effects of potassium nutrition and amount of inoculum on the rate of reproduction of *Meloidogyne incognita*. *J. Wash. Acad. Sci.*, 41 : 393-395.
- OTEIFA, B. A. (1952). Potassium nutrition of the host in relation to infection by a root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Proc. helminth. Soc. Wash.*, 19 : 99-104.
- OTEIFA, B. A. (1953). Development of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, as affected by potassium nutrition of the host. *Phytopathology*, 43 : 171-174.

Accepté pour publication le 14 janvier 1980.